

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária

**INFEÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E CARCINOMA
OROFARÍNGEO**



Maria Cristina da Silva Vieira de Faria Teixeira
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2012

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária**

**INFEÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E CARCINOMA
OROFARÍNGEO**



**Maria Cristina da Silva Vieira de Faria Teixeira
Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Dissertação orientada pelo
Professor Doutor Daniel de Sousa**

2012

Agradecimentos

A elaboração desta tese representa o final de um percurso e também o início de um próximo, para o qual contribuíram várias pessoas.

Ao Prof. Doutor Daniel de Sousa pela sua orientação e pela sua disponibilidade incansável.

Ao Prof. Doutor Paulo Coelho pelo seu conselho e apoio.

Ao meu companheiro de estudo e amigo, Pedro Vieira, que esteve sempre comigo ao longo destes anos clínicos.

Ao Sancho Silvestre pelo apoio e dedicação.

E finalmente aos meus pais e à minha irmã, pois estiveram sempre ao meu lado independentemente das circunstâncias.

Muito Obrigada

Resumo

A incidência do carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo (CPCO) tem aumentado ultimamente em vários países da Europa e EUA, apesar da diminuição dos hábitos tabágicos e alcoólicos. A literatura recente sugere que o aumento de casos de cancro da orofaringe possa estar associado à infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) de subtipo 16 e, em menor número de casos, ao HPV de subtipo 18.

Os HPV são vírus epiteliotrópicos que, na sua maioria, produzem proliferações epiteliais benignas. Algumas estirpes virais, designadas por estirpes de alto risco, podem estar associadas a transformações malignas. Os carcinomas potencialmente associados ao HPV exprimem DNA HPV, estando este integrado no genoma da célula hospedeira, expressando as oncoproteínas E6 e E7 que procedem à inibição das proteínas p53 e pRb, que intervêm na regulação do ciclo celular.

Os doentes CPCO HPV+ parecem exibir características clínicas distintas dos doentes HPV-. Os doentes que apresentam tumores HPV- têm geralmente idades compreendidas entre os 50 e 60 anos, fortes hábitos tabágicos e são maioritariamente indivíduos do sexo masculino. Já os tumores HPV+ ocorrem com igual frequência em indivíduos mais jovens, do sexo masculino e feminino que, frequentemente, não são fumadores nem consumidores habituais de bebidas alcoólicas.

Doentes com CPCO HPV+ parecem estar associados a um melhor prognóstico. A sua melhor resposta às modalidades de tratamento não está clarificada, mas parece estar associada à existência de resposta apoptótica, mediada pela p53 conservada nos tumores HPV positivos.

Devido às limitações inerentes à deteção molecular do HPV e às dificuldades encontradas no estabelecimento de um paralelismo entre as características histológicas e clínicas do CPCO HPV+, as *guidelines* disponíveis para o tratamento do CPCO consideram que o tratamento de CPCO HPV+ e de CPCO HPV- não deve diferir.

Palavras chave: HPV; cancro orofaríngeo; carcinogénese.

Abstract

The rate of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (SCC) has increased recently in Europe and in the United States, in spite of a decrease in smoking and drinking habits. Recent literature suggests that the increase in the rate of oropharyngeal cancer may be related to the human papillomavirus infection (HPV), i.e. to HPV subtype 16 and, in a smaller scale, to HPV subtype 18.

HPV are epitheliotropic viruses that mostly produce benign epithelial proliferations. Some HPV subtypes, classified as high-risk, may be related to subsequent malignant processes. Carcinomas that are potentially related to HPV express DNA HPV; the latter is integrated into the host cell genome and expresses the oncoproteins E6 and E7 which inhibit proteins p53 and pRb intervening in the regulation of the cell cycle.

CPCO HPV+ patients seem to exhibit different clinical features when compared to HPV- patients. Patients with HPV tumours are in the age range of 50-60 years of age; they have strong smoking habits and are mostly male. On the other hand, HPV+ tumours are found in younger patients, with the same frequency among younger females and males with no smoking and drinking habits.

CPCO HPV+ patients have a more favourable prognosis. Better response to different modalities of treatment has not been clarified, but it seems to be associated with an apoptotic response, mediated by p53 that is preserved in positive HPV tumours.

CPCO guidelines for the treatment of CPCO HPV+ and CPCO HPV- do not differ due to inherent limitations in HPV molecular detection and difficulties in drawing a parallel between histological and clinical features.

Keywords: HPV; oropharyngeal cancer; carcinogenesis

Lista de abreviaturas e acrónimos

DNA- ácido desoxirribonucleico

CDK- quinase ciclina-dependente

CPC-carcinoma pavimentocelular

CPCO- carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo

CPCC- carcinoma pavimentocelular cervical

CPCO HPV+ - carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo positivo para o vírus do papiloma humano

CPCO HPV- carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo negativo para o vírus do papiloma humano

EGFR- recetor do fator de crescimento epitelial

HIV- vírus da imunodeficiência humana

HPV- vírus do papiloma humano

HPV AR- vírus do papiloma humano de alto risco

HPV BR- vírus do papiloma humano de baixo risco

IMRT- radioterapia com modulação da intensidade do feixe

mRNA- RNA mensageiro

µm- micrómetros

nm- nanómetros

PCR- *Polymerase chain reaction*

pRb- proteína do gene do retinoblastoma

p53- proteína de supressão tumoral 53

RNA-ácido ribonucleico

TS- timidina sintase

5-FU- 5 fluorouracilo

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	VII
Índice.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1 O vírus do papiloma humano.....	1
2. Estado atual do problema.....	4
3. Objetivos.....	4
4. Metodologia.....	5
5. Resultados.....	6
5.1 Epidemiologia da infecção pelo vírus do papiloma humano e o carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo.....	6
5.2 Fatores de risco associados ao carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo HPV positivo.....	8
5.3 Significado clínico e histopatológico do carcinoma pavimentocelular HPV negativo <i>versus</i> carcinoma pavimento celular HPV positivo.....	9
5.4 Perfil genético do CPC HPV negativo associado aos fatores de risco tradicionais.....	11
5.5 Perfil genético do CPC HPV positivo e expressão do DNA HPV no carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo.....	13
5.6 Dificuldades no diagnóstico do carcinoma pavimentocelular HPV positivo.....	16
5.7 Limitações das técnicas disponíveis para detecção molecular do HPV.....	18
5.8 Significado clínico dos tumores HPV positivos; Opções terapêuticas e prognóstico.....	20
5.9 O papel da vacinação na prevenção do CPCO HPV+.....	23
6. Discussão de resultados.....	24
7. Conclusões.....	29
8. Bibliografia.....	XI
ANEXOS.....	XXXI

1.Introdução

1.1 O vírus do papiloma humano

O vírus do papiloma humano (HPV) pertence ao género *Papillomavirus* e à família *Papovaviridae*. Esta classificação foi feita com base na estrutura da sua cápside viral e na sua composição bioquímica. Os HPVs são pequenos vírus de DNA com 55 nm de diâmetro e com 7,9 quilobases de extensão exibindo um tropismo notável para os epitélios pavimentosos, o qual já foi demonstrado ao nível do colo uterino e da mucosa orofaríngea (Syrjänen *et al.*, 1987).

Este vírus foi detetado pela primeira vez em 1949. Hoje, múltiplos subtipos foram já caracterizados por técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR), que correspondem a mais de 100 genótipos, por apresentarem regiões reguladoras e codificantes distintas. Considera-se que os HPV pertencem a subtipos diferentes quando exibem uma homologia dos seus genótipos inferior a 90% (Syrjänen *et al.*, 2010).

Os HPV são vírus epiteliotrópicos, que na maior parte dos casos estão associados a proliferações epiteliais benignas. No entanto, determinados subtipos virais podem estar associados a processos de malignização. Manifestações clínicas distintas estão associadas a genótipos específicos de HPV (Smith *et al.*, 2004).

No sentido de estabelecer uma correlação entre as características genéticas e biológicas virais específicas e a capacidade que estes vírus apresentam de induzir displasia e invasão a nível cervical, os subtipos de HPV foram classificados como sendo de baixo risco (BR), e de alto risco (AR) (Muñoz *et al.*, 2003).

Os subtipos HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e 89 são considerados vírus de baixo potencial oncogénico ou de baixo risco (BR). Já os subtipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 são classificados como HPV de alto risco (AR) (Muñoz *et al.*, 2006).

Os HPV de baixo risco raramente estão associados a processos de transformação celular (Smith *et al.*, 2004).

Ao nível da cavidade oral a infeção por HPV BR está associada a uma grande variedade de lesões benignas que incluem múltiplos papilomas orais, *verruca vulgaris* (verrugas orais), o condiloma acuminatum, a hiperplasia epitelial focal (doença de

Heck) e também lesões potencialmente malignas ou pré-malignas como a eritroplasia, eritro-leucoplasia e a leucoplasia (Syrjänen *et al.*, 2004; Feller *et al.*, 2009).

Numa pequena minoria das mulheres que sofrem infecção HPV AR, a nível vulvo-vaginal, observa-se o desenvolvimento e progressão para carcinoma pavimentocelular cervical (CPCC), decorridos aproximadamente 12-15 anos desde o momento inicial de infecção. Tem sido sugerido que os HPV de alto risco, nomeadamente o HPV 16 e HPV 18, estão também implicados no desenvolvimento e progressão do carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo (CPCO) (Gillison *et al.*, 2008).

O HPV16 é o subtipo mais comum de HPV AR geralmente detetado em 49% das biopsias de mulheres que apresentam carcinoma pavimentocelular do colo do útero (Fakhry *et al.*, 2006).

Os fatores de risco *major* associados ao desenvolvimento do CPCO são o abuso de substâncias como o álcool e tabaco. No entanto, nos últimos dez anos, tem-se observado um número crescente de indivíduos com CPCO não fumadores e não consumidores de bebidas alcoólicas, que após análise histológica revelam infecção por HPV (Brugere *et al.*, 1986; Turati *et al.*, 2010).

Em 1977, o HPV foi reconhecido como o factor etiológico do CPC ao nível do colo uterino. OS HPV AR têm a capacidade de induzir processos oncogénicos, através da imortalização de células epiteliais humanas, sendo responsáveis pela grande maioria dos tumores do colo uterino e anogenitais. Também tem sido sugerido pela literatura, uma possível associação entre o HPV e alguns dos tumores que ocorrem na região da cabeça e do pescoço, nomeadamente na região da orofaringe (Syrjänen *et al.*, 1987; Fakhry *et al.*, 2006).

Enquanto que nos tumores do colo uterino a infecção por HPV é necessária para que ocorra malignização, nos tumores da cabeça e pescoço, a infecção por HPV é insuficiente para que esta malignização ocorra, sendo observada em apenas 30% destes tumores. Assim, e para se demonstrar o papel etiológico do HPV na patogénese tumoral no território da cabeça e pescoço é fundamental que se demonstre a presença do DNA genómico do HPV (Fakhry *et al.*, 2006; Bodily *et al.*, 2011).

Os genes do HPV foram classificados em iniciais e tardios, em função do momento em que se expressam após a infecção viral. Os genes iniciais expressam-se imediatamente após infecção viral e antes da replicação do DNA e regulam a replicação e

a expressão do DNA viral. No caso dos HPV de alto risco oncogénico, os genes iniciais encontram-se igualmente associados à transformação da célula hospedeira. Os genes tardios codificam para as proteínas estruturais que compõem a cápside viral e são ativados na fase final do ciclo celular (Schwartz *et al.*, 1983; Seedorf *et al.*, 1985).

Embora o HPV possa infectar o epitélio das vias aerodigestivas superiores em geral, a região amigdalina e orofaríngea parecem ser as únicas zonas na região da cabeça e do pescoço suscetíveis de sofrer transformação maligna sendo a causa desta especificidade ainda pouco esclarecida e objeto de investigação (Klussman *et al.*, 2001). O potencial de imortalização celular atribuído ao HPV pode ser resultado da função de duas oncoproteínas virais: as oncoproteínas E6 e E7, que inativam funcionalmente duas proteínas supressoras tumorais: a proteína p53 e a proteína retinoblastoma (pRb), respetivamente (Longworth *et al.*, 2005; Klussman *et al.*, 2009).

A maioria dos autores sugere que a inativação da p53 e da pRb seja efetuada por duas vias diferentes nos tumores HPV positivos e nos tumores HPV negativos (Chang *et al.*, 1994).

Pensa-se que nos tumores HPV positivos as alterações genéticas reflitam a função oncogénica viral: os tumores HPV positivos expressam p53 *wildtype* sendo esta degradada precocemente através de uma via mediada pela ubiquitina. Esta degradação precoce da p53 condiciona uma acumulação de erros genéticos e inibição da apoptose. A proteína E7 inibe a expressão da proteína retinoblastoma (pRb), o que se traduz por uma perda de regulação e imortalização celular epitelial (Chang *et al.*, 1994). Pelo contrário, nos tumores HPV negativos a proteína p53 não se expressa na forma *wildtype*. Mutações ao nível do gene TP53 (originadas pelo tabaco ou álcool) condicionam a expressão de uma forma anómala da mesma proteína. Observam-se ainda nestes tumores elevados níveis do fator epidérmico de crescimento epitelial (EGFR) e uma alteração da pRb por amplificação da ciclina D e inativação da p16 (Chang *et al.*, 1994; Reimers *et al.*, 2007; Bodily *et al.*, 2011).

2.Estado atual do problema

A incidência do carcinoma pavimento celular oral e orofaríngeo (CPCO) tem vindo a aumentar nos últimos anos em vários países da Europa e dos EUA, apesar da diminuição dos hábitos tabágicos e alcoólicos. A literatura mais recente tem sugerido que o aumento do número de casos de cancro da orofaringe, em particular da amígdala, possa estar associado à infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) de subtipo 16 e, em menor número de casos, ao HPV de subtipo 18.

3.Objetivos

Os objetivos fundamentais deste trabalho são os seguintes:

- Esclarecer os dados epidemiológicos relativos à infeção oral por HPV;
- Identificar os fatores de risco associados à infeção por HPV;
- Caracterizar o tropismo epitelial do HPV ao nível das mucosas, salientando os eventos genéticos e moleculares associados a um possível efeito carcinogénico;
- Caracterizar clinicamente os doentes CPCO HPV+ e distingui-los dos doentes CPC HPV-, esclarecendo a sua importância em termos de prognóstico e resposta às modalidades de tratamento disponíveis.

4. Metodologia

Os artigos científicos foram pesquisados utilizando as base de dados *Pubmed*, *Medline* e *Science Direct*, entre os períodos 20/09/11 e 20/06/12, utilizando as seguintes palavras-chave, em inglês, correspondentes a: “*HPV e caracterização genética*”, “*classificação HPV*”, “*HPV e carcinoma pavimentocelular orofaríngeo*”, “*etiologia do carcinoma pavimentocelular orofaríngeo*”, “*carcinoma pavimentocelular orofaríngeo HPV positivo*”, “*tabaco e álcool e etiologia do carcinoma pavimentocelular orofaríngeo*”, “*tratamento e cancro orofaríngeo*”, “*quimioterapia e radioterapia em doentes com cancro orofaríngeo*”.

Recorreu-se ainda à pesquisa de obras existentes em diversas bibliotecas, nomeadamente as bibliotecas da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, e as bibliotecas do Imperial College of Science Technology and Medicine e do King’s College of London (Guy’s Hospital), em Londres.

5.Resultados

5.1 Epidemiologia da infecção pelo vírus do papiloma humano e o carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo

Diversos estudos têm vindo a evidenciar um aumento de incidência do carcinoma pavimentocelular a nível orofaríngeo, na Europa e nos Estados Unidos da América, embora a exposição ao álcool e ao tabaco tenham diminuído significativamente (Brugere *et al.*, 1986; Westra *et al.*, 2009).

Uma etiologia viral para o cancro orofaríngeo, semelhante à do cancro do colo uterino, foi sugerida por observação do facto de a transmissão do HPV entre parceiros sexuais estar possivelmente associada a um maior risco de desenvolvimento de cancro da cabeça e do pescoço (Schwartz *et al.*, 1998).

Aproximadamente 7% da população dos EUA, com idades compreendidas entre os 14 e os 69 anos, apresenta infecção oral por HPV, sendo o número de homens infetados mais do que o dobro do número de mulheres infetadas (2,3:1) (D'Souza *et al.*, 2009).

Num estudo transversal levado a cabo pelo National Cancer Institute em 2010, com análise de 5 501 doentes, registou-se que 6.9% dos doentes apresentavam infecção oral por HPV dos quais 3,7% por HPV AR e os restantes 3,2% por HPV BR. O subtipo de HPV detetado com maior frequência foi o HPV16. Neste mesmo estudo, procurou-se estabelecer uma correlação entre as seguintes variáveis independentes: infecção por HPV, dados sociodemográficos e hábitos sexuais dos doentes. Concluiu-se, que as infeções por HPV, ocorrem com maior frequência nos indivíduos entre os 30-35 anos e entre os 50-54 anos, com incidência semelhante em indivíduos do sexo masculino e feminino. O risco de infecção encontra-se ainda aumentado para indivíduos fumadores de 10 ou mais cigarros por dia e em indivíduos com história de múltiplos parceiros sexuais.

De acordo com o anterior estudo e com as investigações de D'Souza *et al.*, em 2009, a transmissão do HPV é feita por via sexual ou oro-genital, dado que a infecção por HPV é rara em indivíduos que ainda não iniciaram a sua atividade sexual, e que o risco de infecção por HPV aumenta cerca de oito vezes em indivíduos com dois parceiros sexuais. Assim, o risco aumenta com o aumento do número de parceiros sexuais.

Kreimer *et al.*, em 2004 referem uma correlação forte entre a infecção viral por HPV ao nível das amígdalas palatinas e a idade dos doentes: em 91% dos casos

detectou-se, por técnicas de PCR, DNA HPV 16 em doentes com uma idade inferior a 40 anos. A prevalência de HPV 16 a nível amigdalino, por técnicas de hibridização *in situ* varia entre 50 e 84% para doentes com uma idade média de 50 anos. Para doentes com mais de 60 anos a prevalência da infeção por HPV assume já valores na ordem dos 21 a 46%.

A razão pela qual a infeção oral por HPV parece ocorrer preferencialmente em indivíduos mais jovens ainda não foi esclarecida, mas pode estar associada à vulnerabilidade do epitélio amigdalino, que se assemelha à do colo do útero (Muñoz *et al.*, 2003; Hansson *et al.*, 2009; Bodily *et al.*, 2011).

São múltiplos os estudos que apontam para uma possível relação entre o comportamento sexual e o risco de desenvolvimento de uma infeção por HPV. Nos países desenvolvidos, a prática de sexo oral começa cedo entre os jovens, razão pela qual se pode verificar uma exposição precoce da orofaringe à infeção pelo HPV. Para ilustrar esta situação podemos referir os estudos de Hansson *et al.*, de 2009, que descrevem a proporção de carcinomas amigdalinos HPV positivos, na Suécia: para os anos de 2000-2002 a proporção de CPCO HPV+ foi de 68%; já para o período de 2003-2005 foi de 77% e para o período de 2006-2007 foi de 93%. Assim, é importante referir que, se por um lado, a prevalência de tumores HPV negativos, durante este período diminui, por outro, no mesmo período, a prevalência de CPCO HPV+ aumentou.

Os estudos epidemiológicos mais recentes indicam que a proporção de CPCO que pode estar associada à infeção por HPV tem vindo a aumentar desde 1974 até 2009 nos EUA, provavelmente devido às alterações observadas no comportamento sexual dos jovens. A literatura disponível diz-nos que 35% dos jovens que referem nunca terem tido relações sexuais antes dos 18 anos, afirmam já terem tido contactos oro-genitais (D'Souza *et al.*, 2009).

5.2 Fatores de risco associados ao carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo HPV positivo

Os doentes com carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo são tipicamente indivíduos com mais de 60 anos, fumadores e consumidores de bebidas alcoólicas durante longos períodos de tempo (Garrett *et al.*, 1993).

Nas últimas décadas tem-se observado um número crescente de casos de doentes mais jovens (idades compreendidas entre os 40 e os 55 anos) não fumadores e não consumidores de bebidas alcoólicas e que apresentam CPCO. Nestes tem sido identificada a presença de biomarcadores específicos do HPV. Assim, aos reconhecidos fatores de risco, tabaco e álcool, deve ser associada a infeção por determinados tipos do vírus do papiloma humano (HPV) (Marklund *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura mais recente, o CPCO HPV- ocorre com maior frequência em indivíduos do sexo masculino. Contudo em CPCO HPV+ parece observar-se uma prevalência semelhante em indivíduos do sexo feminino e masculino (Westra *et al.*, 2009).

Os estudos epidemiológicos demonstram claramente que o vírus HPV é transmitido por via sexual, aumentando o risco de infeção com o aumento do número de parceiros sexuais, com história de sexo oro-genital ou oro-anal e com a presença de verrugas genitais. Salientam ainda que quanto mais cedo for o momento da primeira relação sexual maior é a probabilidade de ocorrer posterior infeção pelo HPV, principalmente se esta ocorrer antes dos 18 anos de idade. Assim, a via oral-ano-genital pode ser uma importante via de transmissão do HPV para a cavidade oral (D' Souza *et al.*, 2009). A imunossupressão parece ser ainda outro potencial fator de risco a ter em consideração: doentes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), apresentam com maior frequência infeção oral persistente por HPV e posterior progressão CPCO. Os doentes com anemia de Fanconi apresentam igualmente suscetibilidade genética aumentada para os processos tumorogénicos mediados pelo HPV (Palefsky *et al.*, 2009). A associação e a prevalência do HPV em infecções orais, o mecanismo de infeção, o potencial oncogénico e ainda a sua influência ao nível da carcinogénese oral, estão ainda por compreender na sua totalidade (Syrjänen *et al.*, 2004).

5.3 Significado clínico e histopatológico do carcinoma pavimentocelular HPV negativo *versus* carcinoma pavimentocelular HPV positivo

A divergência dos dados epidemiológicos inerentes ao carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo tem vindo a acentuar o seu carácter díspar (Muñoz *et al.*, 2003).

Os estudos clínicos, histológicos e moleculares sugerem a existência de características tumorais específicas que permitem a subclassificação destes tumores em CPCO HPV positivos e CPCO HPV negativos (Westra *et al.*, 2009; Syrjänen *et al.*, 2010).

Bodily *et al.*, em 2011, sugerem que os doentes CPCO HPV positivos podem ser identificados como um subgrupo distinto de CPCO por apresentarem características clínicas e biológicas específicas e diferentes dos CPCO HPV negativos. Em relação ao seu comportamento clínico, os autores referem que os doentes CPCO HPV+ estão associados a um prognóstico mais favorável, provavelmente devido à vigilância imunitária dos antígenos tumorais virais específicos e ao facto de haver uma resposta apoptótica à radiação ionizante.

Relativamente às suas características histológicas, parece que os CPCO HPV+ se caracterizam por um infiltrado maioritariamente linfocitário e por uma queratinização pouco pronunciada, as células assumem uma disposição em forma de “cesto” dando origem a um padrão trabecular. Estas células caracterizam-se por núcleos hiper-cromáticos e apresentam margens pouco definidas; evidenciam igualmente uma morfologia predominantemente basaloide. Estes tumores parecem estar associados a um baixo grau de diferenciação e a uma menor acumulação de erros genéticos que os CPCO HPV negativos. Em contraste, nos tumores CPCO HPV- observam-se células poligonais com citoplasma maduro e abundante e as margens celulares estão bem delimitadas. É importante ainda referir que estes tumores estão associados a um padrão de crescimento infiltrativo (Westra *et al.*, 2009; American Cancer Society, 2012).

A meta-análise efectuada por Syrjänen *et al.*, em 2004, bem como os estudos de Paz *et al.*, em 1997, e também de Snidjers *et al.*, em 1992, evidenciam que a infeção por HPV é significativamente mais frequente nos CPC orofaríngeos do que nos CPC que ocorrem noutras regiões da cabeça e do pescoço. Assim, supõe-se que entre 50 a 60 % dos CPCO amigdalinos são HPV+, o que se deve provavelmente a um tropismo epitelial

específico. Nas outras regiões do território oro-maxilo-facial, a prevalência da infecção por HPV é bastante inferior e ronda os 15-20%.

No sentido de esclarecer o papel do HPV na etiologia do CPCO, a investigação tem sido dirigida também para a análise de outras condições orais associadas ao mesmo vírus, nomeadamente papilomas pavimentocelulares solitários. Em 1974, Greer and Goldman analisaram 110 lesões de papilomas orais, nas quais não detetaram anomalias histológicas e morfológicas.

Syrjänen *et al.*, em 1983, detetaram cinco casos HPV+ em nove casos de papilomas pavimentocelulares analisados. Para além disso, oito destes nove casos apresentavam sinais de coilocitose, o efeito citopático específico associado ao HPV. Estas observações pioneiras foram precedidas por estudos com amostras mais significativas que vieram confirmar as observações anteriores, evidenciando o envolvimento do HPV não só ao nível dos papilomas pavimentocelulares como também possivelmente ao nível do CPCO (Syrjänen *et al.*, 1983; Syrjänen *et al.*, 1987).

Desde as primeiras observações de Syrjänen em 1983, as publicações sobre a possível relação entre o HPV e o carcinoma pavimentocelular orofaríngeo têm sido múltiplas, estudando os níveis de DNA HPV em CPCO com taxas que variam dos 0 a 100% (Syrjänen *et al.*, 2010). Os valores mais elevados têm sido atribuídos a cancros HPV positivos ao nível das amígdalas palatinas e na base da língua. Esta grande amplitude de valores percentuais é, provavelmente, devida à variabilidade da localização anatómica do cancro, localização geográfica dos doentes e também devido ao facto de as amostras utilizadas neste tipo de estudos serem muito reduzidas e altamente variáveis. Até ao momento, a proporção exata de CPCO associada a este tipo de infecção viral é incerta (Syrjänen *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 2009).

De elevado interesse são também as observações de Gillison *et al.*, em 2000. Após análise das amostras, detetou DNA HPV em 25% das mesmas (62/253). Esta análise revelou ainda que 90% das amostras HPV+ correspondiam a infeções pelo HPV 16. Neste mesmo estudo, observou-se que as amostras de CPCO HPV positivos correspondiam com maior frequência à região orofaríngea (57%), do que ao nível da cavidade oral (12%). A sobrevivência média estimada para os doentes incluídos neste estudo, foi de 85 meses. No entanto, a sobrevivência observada para os doentes CPCO HPV- foi de 76 meses, enquanto que para os doentes CPCO HPV+ foi perto de 91 meses.

5.4. Perfil genético do CPC HPV negativo associado aos fatores de risco tradicionais

Os fatores de risco, potencialmente envolvidos no desenvolvimento de CPCO, têm sido extensamente estudados. Contudo, pouco conclusivos têm sido os trabalhos posteriores a Wynder *et al.*, em 1961, que sugeriram o tabaco, o álcool, as deficiências nutricionais principalmente vitamínicas e em molibdênio, zinco e mais recentemente a infecção por HPV como os fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento de CPCO.

O processo pelo qual o tabaco aumenta o risco de CPCO HPV- não está ainda completamente caracterizado, mas tanto a nível do colo do útero como a nível da orofaringe o número de células de Langerhans encontra-se diminuído em indivíduos fumadores, sugerindo uma diminuição da eficácia da imunidade inata. A nicotina e cutinina têm sido detectadas na secreção salivar e no muco do colo do útero. É ainda importante referir que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes no tabaco, como o benzopireno, são componentes com capacidade genotóxica (Brugere *et al.*, 1986).

O gene TP53 codifica para a proteína p53 que, na sua forma normal, intervém na sinalização e transdução de sinal associadas à paragem do ciclo celular na fase G1 para que ocorra reparação do DNA. No caso de existirem erros irreparáveis, ativa o mecanismo de morte celular apoptótica (Chang *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 2002).

Em amostras de CPCO HPV negativos, observam-se mutações ao nível do gene TP53, o que condiciona alterações na proteína p53. Esta proteína torna-se ineficaz na sinalização da reparação do DNA, o que provoca instabilidade genética. Do mesmo modo, os mecanismo de apoptose, que deveriam ocorrer em resposta às lesões do DNA, não são ativados e assiste-se ao aparecimento de células cancerosas. A perda da função normal da proteína p53 pode estar associada à exposição a agentes carcinogénicos. A mucosa orofaríngea encontra-se continuamente exposta a carcinogénicos ambientais e irritantes químicos, incluindo o tabaco e o álcool. Alguns destes agentes induzem a substituição de pares de bases de DNA, provocando mutações ao nível do gene TP53. Em CPCO HPV negativos, observam-se igualmente mutações ou perdas alélicas como resultado de exposições exógenas a carcinogénicos (Levine *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1994).

Ocorrem amplificações na região 11q13 em cerca de 45% dos CPCO HPV- o que vai ter influência sobre o gene CCND1 que codifica para a Ciclina D1. A Ciclina D1 é uma proteína com funções reguladoras importantes do ciclo celular e que se liga à CDK4 ou CDK6 para fosforilar e inativar a proteína retinoblastoma (pRb), conduzindo desta forma a passagem da fase G1 à fase S do ciclo celular. O complexo CDKN2A/p16 contrabalança a função desempenhada pela Ciclina D1, por regular a ativação da proteína Rb (Zur Hausen *et al.*, 1991; Braakhuis *et al.*, 2004).

No entanto, elevados níveis de expressão da Ciclina D1 desregulam esta etapa do ciclo celular, observando-se alterações ao nível da pRb, o que condiciona que alterações ocorridas em G1 não sejam reparadas, ocorrendo duplicação dos erros anteriores e perpetuação ao longo das próximas gerações celulares (Braakhuis *et al.*, 2004).

É ainda importante referir os elevados níveis de EGFR em CPCO HPV-, que não se observam em CPCO HPV+ (Licitra *et al.*, 2006).

Os elevados níveis do EGFR estão geralmente associados a um prognóstico menos favorável devido ao elevado número de recidivas e metastizações à distância. Os baixos níveis de EGFR observados em CPCO HPV+ podem estar na origem de um prognóstico mais favorável (Licitra *et al.*, 2006).

Contudo há que ter em consideração que o prognóstico de sobrevivência deste tipo de doentes está também associado a múltiplos fatores tais como: metástases nos gânglios linfáticos regionais, idade superior a 60 anos, quantidade e frequência de consumo de bebidas alcoólicas e de tabaco (Lang *et al.*, 2009 e Kreppel *et al.*, 2011).

5.5 Perfil genético do CPC HPV positivo e expressão de DNA HPV no carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo

Em 1995, a International Agency for Research on Cancer (IARC) reconhece o potencial oncogénico em células epiteliais humanas dos HPV subtipos 16 e 18, de acordo com evidências de base molecular e epidemiológica. O cancro do colo uterino encontra-se intimamente associado à infeção por HPV, nomeadamente por HPV 16 e 18. Estes dois subtipos virais são responsáveis por cerca de 70% de todos os casos de cancro do colo uterino. Adicionalmente, os HPV AR estão associados a carcinomas ano-genitais, incluindo carcinomas vulvares, anais e alguns carcinomas pavimentocelulares que ocorrem ao nível oral e orofaríngeo (CPCO).

Apesar de as infeções virais por HPV se encontrarem intimamente associadas ao desenvolvimento do carcinoma pavimentocelular, parece que as lesões iniciais induzidas pelo HPV representam apenas uma fase pré-maligna e que se devem reunir outros fatores para que haja uma transformação maligna (Syrjänen *et al.*, 1987; Zur Hausen *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 1994).

Segundo os estudos de Garrett *et al.*, de 1993, células epiteliais primárias obtidas a partir de CPCO HPV-, que se encontram imortalizadas, não sofrem transformação. No entanto, quando infectadas por HPV, adquirem um fenótipo tumorogénico e observa-se ativação do oncogene *ras*. Os resultados destes estudos evidenciam a hipótese de que o HPV é necessário, mas não suficiente, para que haja progressão para uma situação de malignidade, observando-se sinergismo com agentes carcinogénicos.

Podem ainda ocorrer outras alterações genéticas ao nível dos genes supressores tumorais RB, APC, MCC, DCC com repercussões ao nível do CPCO (Chang *et al.*, 1994).

Lohavanichbutr *et al.*, em 2009, analisaram o perfil genético de amostras de CPCO HPV+ e de CPCO HPV- . Estes autores verificaram que 34% (41/119) dos CPCO analisados eram HPV+ e que na sua maioria se deviam a infeções por HPV do subtipo 16 ou 33. A análise do perfil genético dos CPCO HPV+ revelou sobre-expressão de múltiplos genes envolvidos na regulação da replicação do DNA, ciclo celular e proliferação celular como: TP53, RPA2, LIG1, POLDI, POLH, MCM2, MCM3, MCM7, NASP, CDC7, CCNE2, CDKN2A, CDK2, RBBP4, PCNA e Ki67.

Estes estudos salientam ainda a existência de uma relação inversa, observada entre as mutações que ocorrem ao nível do gene TP53 e a presença do HPV.

Assim, sugere-se a existência de duas vias independentes, mas sobreponíveis, no desenvolvimento do CPCO, em que a primeira está associada ao efeito dos carcinogénicos ambientais (como o tabaco e o álcool) e a segunda à infeção viral por HPV (Lohavanichbutr *et al.*, 2009).

As mutações e aberrações genéticas provocadas pelo álcool e tabaco são muito significativas e condicionam transformação celular, o que não se observa nas células infetadas pelo HPV. A exposição ao HPV 16, 18 ou 33 está provavelmente associada à imortalização dos queratinócitos (Brugere *et al.*, 1986; Garrett *et al.*, 1993).

O ciclo de vida do HPV está associado ao processo de diferenciação dos queratinócitos. A infeção inicial ocorre em situações de lesão epitelial que expõem as células da camada basal, nas quais o genoma viral é mantido sob a forma de cópias episomais. À medida que os queratinócitos vão sofrendo diferenciação, há amplificação e integração do genoma viral e finalmente produção de viriões (Stoppler *et al.*, 1996).

O CPCO pode estar associado a infeções persistentes pelo HPV através da ação das oncoproteínas E6 e E7. Apenas as oncoproteínas E6 e E7 codificadas por HPV AR contribuem para o desenvolvimento de lesões malignas por apresentarem elevada afinidade de ligação às moléculas alvo, induzindo transformação celular (Anexo1) (Chang *et al.*, 1994; Bodily *et al.*, 2011).

As células amigdalinas infectadas com HPV AR apresentam elevados níveis de mRNA das proteínas E6 e E7, o que se traduz por um aumento da concentração das mesmas proteínas ao nível da célula hospedeira (Herrington *et al.*, 1996). O mecanismo de evasão à supressão tumoral, em CPCO HPV+, é feito pela inativação da proteína p53 pela oncoproteína E6 codificada por HPV AR, o que se traduz por uma diminuição da capacidade celular de desencadear o processo apoptótico. A proteína E6 liga-se à ubiquitina ligase E6AP, o que permite o sequestro da p53; ocorre então ubiquitinização e *turnover* acelerado da p53 (Moody *et al.*, 2010). A degradação precoce da p53 está associada à inativação da apoptose e à indução de instabilidade genética. Para além disso, a oncoproteína E6 inativa a telomerase, uma enzima que mantém a estabilidade do DNA telomérico. A oncoproteína E7 liga-se à proteína retinoblastoma (pRb), inativando-a e impedindo desta forma que haja inibição do fator de transcrição E2F, o

que se traduz por perda de regulação do ciclo celular. Acresce que a inativação da pRb condiciona o aumento dos níveis (*up regulation*) da proteína p16 (Anexo 1) (Chang *et al.*, 1994; Pyeon *et al.*, 2007).

Os estudos de Hafkamp *et al.*, em 2009, são consistentes com estas observações e evidenciam ainda a diminuição dos níveis (*down regulation*) da Ciclina D1. Em situações normais, a p16, codificada pelo gene supressor tumoral CDKN2A, regula a atividade da Ciclina D-CDK4/6. A Ciclina D-CDK4/6 que vai fosforilar a pRb, permite a libertação do fator de transcrição E2F, levando à progressão do ciclo celular (Gillison *et al.*, 2010).

Considera-se que os doentes CPCO HPV+ se caracterizam pela expressão de elevados níveis de p16, devido à inativação de pRb pela oncoproteína E7, o que pode ser facilmente detetado por técnicas simples de imunohistoquímica (Pyeon *et al.*, 2007).

A proteína p16 é um biomarcador extremamente útil e com elevado valor de diagnóstico e de estimativa do prognóstico em doentes com CPCO HPV+. Pode existir alguma correlação entre a sobre-expressão da proteína p16 e a resposta dos tumores orofaríngeos HPV positivos à radiação (Klussman *et al.*, 2009).

Atualmente, tem sido sugerido que os doentes CPCO HPV positivos apresentem melhor prognóstico por apresentarem uma melhor resposta ao tratamento oncológico, nomeadamente através de cirurgia e/ou radioterapia. Uma possível explicação para a radiosensibilidade dos CPCO HPV+ está associada à *up regulation* do RBBP4, um gene que demonstrou induzir radiosensibilidade em tumores HPV+. Estes doentes, para além de apresentarem uma resposta mais favorável ao tratamento, apresentam ainda um risco decrescido de recidivas e metastização à distância, o que também está associado à sua maior longevidade (Gillison *et al.*, 2010).

Apesar de não se conhecer o mecanismo pelo qual os CPCO HPV+ apresentam melhor prognóstico, sabe-se que as células infectadas por HPV podem sofrer hipóxia o que facilita a indução da apoptose. Estes doentes apresentam igualmente melhores resultados terapêuticos quando submetidos a quimioterapia ou radioterapia (Meyer *et al.*, 2010).

5.6 Dificuldades no diagnóstico do carcinoma pavimentocelular HPV positivo

Um dos grandes problemas, associados aos doentes CPCO HPV positivos, prende-se com o facto de estes serem inicialmente mal diagnosticados. As confusões mais frequentes são feitas com infeções do trato aerodigestivo, sendo os doentes submetidos a antibioticoterapia durante períodos de tempo prolongados, o que retarda o diagnóstico do tumor (Cohen *et al.*, 2008).

Assim a realização de uma história clínica adequada e de um exame objetivo, preciso, são cruciais e indispensáveis para que se chegue a um diagnóstico rigoroso. Durante a realização da história clínica deve fazer-se o registo da idade, estado civil e do sexo do doente, do seu nível socioeconómico, da história de abuso de substâncias como o álcool e o tabaco. É importante questionar o doente relativamente à sua orientação sexual, à história de contactos sexuais e/ou de sexo oral. A identificação do número de parceiros sexuais, a história de doenças venéreas ou verrugas genitais e de outros hábitos sexuais específicos são essenciais no sentido de avaliar o risco de infeção por HPV, especialmente em doentes que aparentem quadros de faringite. É notório que este tipo de questionário médico, embora feito no âmbito exclusivamente clínico, envolve alguns problemas de ordem ética e pode ser ainda invasivo da esfera da liberdade individual, o que o torna particularmente delicado (D' Souza *et al.*, 2009).

Durante o exame objetivo, é importante identificar as lesões que suspeitamos serem de CPCO e que tenham indicação para a realização de biopsia. Uma vez obtidos os resultados e confirmado o diagnóstico de CPCO, é importante reavaliar o envolvimento ganglionar, a exposição ou não a fatores de risco como o álcool e o tabaco e rever os dados relativos à história da atividade sexual do doente. Tendo em consideração os dados clínicos disponíveis, deve pedir-se análise molecular para eventual deteção do HPV (American Cancer Institute, 2012).

As amostras são enviadas para o laboratório, onde se procede ao isolamento do DNA, para eventual deteção de DNA. Quando o DNA HPV é identificado é importante que se defina o subtipo, pois geralmente as amostras são testadas para 37 subtipos de DNA HPV, dos quais 18 correspondem a HPV AR (NHS, 2010; American Cancer Institute, 2012).

Para proceder à detecção molecular do DNA HPV é importante que os instrumentos de diagnóstico sejam altamente sensíveis, específicos e reprodutíveis (Gillison *et al.*, 2010).

Atualmente as técnicas de PCR estão definidas como *gold-standard* para detecção e quantificação do mRNA das proteínas E6 e E7. No entanto, há uma grande controvérsia quanto ao que deve ser considerado evidência fisiopatológica de infecção por HPV. O uso da classificação histológica para a determinação do envolvimento ou não do HPV no CPCO não tem sido bem aceite pela maioria dos autores, o que se deve provavelmente à falta de estudos que correlacionem os critérios histológicos com o prognóstico do doente (Lohavanichbutr *et al.*, 2009).

É reconhecido que os doentes CPCO HPV+ apresentam melhor prognóstico. Melhores resultados clínicos têm sido obtidos tanto em doentes HPV+ submetidos a ressecção cirúrgica como em doentes irradiados (Cohen *et al.*, 2008). No entanto, a abordagem terapêutica deve ser igual quer em doentes HPV positivos, quer em doentes HPV negativos até que se determinem resultados totalmente conclusivos quanto à existência de diferenças de diagnóstico nos dois grupos (Lohavanichbutr *et al.*, 2009; National Cancer Institute 2012).

É importante notar ainda que clinicamente os tumores associados a uma elevada queratinização estão associados à infecção por HPV; no entanto, a infecção por este vírus ocorre efetivamente apenas em 70% destes casos. Dado não existir uma elevada fiabilidade nem clínica nem histológica de detecção de tumores HPV positivos e negativos, a abordagem inicial do doente CPCO deve ser semelhante quer em doentes CPCO HPV+ quer em doentes CPCO HPV- (Chernock *et al.*, 2009; Gillison *et al.*, 2010).

A realização de um diagnóstico específico é um passo crucial pois é este que vai orientar todo o plano de tratamento: a existência de falsos positivos pode levar à exclusão de importantes mecanismos terapêuticos ou eventualmente à exclusão da hipótese de cirurgia. Assim, apenas técnicas e métodos *standard* devem auxiliar os clínicos a fazer um diagnóstico efetivo (Cohen *et al.*, 2008; Gillison *et al.*, 2010; Decuseara *et al.*, 2011).

5.7 Limitações das técnicas disponíveis para deteção molecular do HPV

Do ponto de vista laboratorial, atualmente dispomos de múltiplas técnicas para deteção molecular do HPV, embora as suas limitações sejam variadas (Chernock *et al.*, 2009).

Os métodos comuns imunohistoquímicos permitem detectar a expressão viral das proteínas E5, E6 e E7 que constituem marcadores críticos na deteção do HPV. Contudo, se obtivermos um resultado positivo para a p16, é importante referir que isso não é suficiente para discriminarmos se o CPCO está ou não associado à integração do HPV, razão pela qual estes métodos são considerados de baixa sensibilidade (Petersen *et al.*, 2009; Syrjänen *et al.*, 2010; Decuseara *et al.*, 2011).

Um dos métodos amplamente utilizado é a *hibridação in situ*. Esta técnica veio permitir não só a deteção e a identificação de HPV de alto e baixo risco como também contribuiu para a definição da localização topográfica da infeção, embora com baixa sensibilidade. Outro método utilizado, é o método de deteção de anticorpos monoclonais. Este método não é fiável, devido à limitada quantidade de anticorpos monoclonais anti-HPV (Petersen *et al.*, 2009; Syrjänen *et al.*, 2002).

Recorrendo a técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é possível detetar um elevado espectro de subtipos de HPV. A elevada sensibilidade que se conseguiu obter com esta técnica deve-se ao facto de a deteção ser feita com *primers* específicos ou *primers* que apresentam sequências *consensus* (Cohen *et al.*, 2008; Syrjänen *et al.*, 2002).

É ainda importante referir a citologia exfoliativa que pode ser considerada para execução de um diagnóstico precoce preciso devido à sua natureza não invasiva. Segundo os estudos de Goon *et al.*, de 2009, casos de CPCO HPV+ foram detetados precocemente através de células recolhidas por citologia exfoliativa. Estas células foram posteriormente utilizadas como biomarcador de previsão de risco de desenvolvimento tumoral associado ao HPV. Esta técnica é de elevada utilidade clínica pois permite a deteção de alterações em genes supressores tumorais e de alterações no padrão genético, que nos aumentam a probabilidade de deteção de tumores num estágio inicial. A avaliação serológica para o HPV em tumores da cabeça e do pescoço é menos sensível que a citologia exfoliativa (Syrjänen *et al.*, 2002; Hristozova *et al.*, 2011).

A detecção de DNA HPV AR, por intermédio de citologia exfoliativa, e dos seus plasmídeos e locais de integração específica, pode servir como marcador para monitorização da presença de tumores residuais após cirurgia, irradiação ou para avaliação de recidiva e progressão (Oane *et al.*, 2011).

5.8 Significado clínico dos tumores HPV positivos; Opções terapêuticas e prognóstico

O tratamento de doentes com carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo é primordialmente cirúrgico, quando exequível, sendo em qualquer caso a decisão terapêutica de natureza multidisciplinar, envolvendo o cirurgião, o radioterapeuta e o médico oncologista. A cirurgia para ressecção local do tumor, bem como a possível cirurgia para remoção dos gânglios cervicais, é individualmente planeada para cada paciente (Regezi *et al.*, 2008).

A cirurgia é de facto a principal modalidade de tratamento a considerar em doentes oncológicos orais. Relativamente aos princípios cirúrgicos, há que salientar a importância das margens de segurança. Estas dependem da localização, do tamanho e do estágio do tumor e devem ter, a nível oro-cervical, pelo menos 1cm de extensão de tecidos sem lesão, podendo ser necessário ainda proceder à exérese de outras estruturas anatómicas, para que este possa ser removido de acordo com o princípio da excisão do tumor em bloco. O planeamento cirúrgico deve obrigatoriamente ter em conta esta ressecção com margens livres de tumor e também os procedimentos reconstrutivos necessários (De Sousa, 2010).

De acordo com De Sousa, Daniel (2009), há ainda a considerar a necessidade de esvaziamento ganglionar cervical quando houver evidência de adenopatias metastáticas cervicais ou elevada probabilidade de elas existirem, consoante a dimensão da lesão.

No caso dos carcinomas da orofaringe, a excisão cirúrgica pode determinar defeitos importantes da fala e da deglutição. Assim, nos estádios iniciais e que não se acompanhem de metástases cervicais pode ser utilizada a radioterapia como terapêutica de primeira linha. De qualquer modo, existem protocolos terapêuticos para esta decisão. No caso de ser decidido fazer tratamento com radioterapia, esta é aplicada na modalidade de fracionamento. A radioterapia pode ser aplicada com modulação da intensidade do feixe (IMRT), a qual consiste na aplicação de radioterapia recorrendo a técnicas 3D. A IMRT é útil para reduzir a toxicidade tardia dos tumores da oro faringe, seios paranasais e nasofaringe pela marcada redução da dose ao nível das glândulas salivares, lobos temporais, estruturas auditivas e visuais (National Cancer Institute, 2012).

A quimioterapia baseia-se na aplicação de fármacos com efeito antineoplásico

que atuam ao nível do ciclo celular, afetando principalmente as células de crescimento rápido (American Cancer Society, 2012).

Como estes fármacos causam danos celulares, são considerados citotóxicos ou citostáticos, e podem conduzir à entrada das células em apoptose. Os agentes quimioterápicos agrupam-se em agentes alquilantes (ex: cisplatina), em anti-metabólicos (ex: 5-Fluouracilo), em inibidores mitóticos (ex: paclitaxel), inibidores anti-tumorais e inibidores da topoisomerase (American Cancer Society, 2012).

A literatura disponível diz-nos que as linhagens celulares que expressam baixos níveis de ciclina D1 são mais sensíveis à cisplatina. Para além disso, a cisplatina tem a capacidade de suprimir o mRNA E6, permitindo o restabelecimento da função da proteína p53. Assim, esta modalidade de tratamento poderá ser adequada para doentes CPCO HPV+. O 5-fluouracilo (5-FU) tem como enzima alvo a timidina sintase (TS). Indivíduos que expressam elevados níveis de TS estão associados a uma baixa resposta à quimioterapia com 5-FU, como é o caso dos doentes CPCO HPV+, o que pode sugerir que este subgrupo seja mais resistente a esta modalidade terapêutica. O gene STMN1, codifica para uma proteína envolvida na regulação dos microtúbulos. Os elevados níveis desta proteína estão associados a uma diminuição da sensibilidade ao paclitaxel *in vitro*. Doentes CPCO HPV+ apresentam elevados níveis desta proteína e portanto provavelmente serão mais resistentes ao paclitaxel (Regezi *et al.*, 2008; Goon *et al.*, 2009; American Cancer Society, 2012).

A modalidade combinada de quimioterapia e radioterapia oferece vantagens, principalmente em casos de CPCO detetados num estágio pouco avançado, pois permitem uma maior preservação das estruturas anatómicas (Lohavanichbutr *et al.*, 2009).

Em doentes CPCO HPV negativos, a taxa de sobrevivência é geralmente mais baixa devido à elevada taxa de recidiva havendo maior incidência de invasão ganglionar, provavelmente associada aos elevados níveis de EGFR e baixos níveis de p16 (Weinberger *et al.*, 2006; Reimers *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2008).

Doentes com CPCO HPV+ parecem estar associados a um melhor prognóstico independentemente da modalidade de tratamento utilizada, embora os melhores resultados se tenham obtido com ressecção cirúrgica coadjuvada por radioterapia fraccionada convencional e modificada (Licitra *et al.*, 2006; Lohavanichbutr *et al.*, 2009).

O debate atual em relação aos doentes CPCO HPV+ prende-se com o facto de não haver necessidade de uma terapia tão agressiva. A razão pela qual estes doentes apresentam uma melhor resposta ao tratamento ainda não está completamente esclarecida, mas está provavelmente associada à existência de resposta apoptótica, mediada pela p53 conservada nos tumores HPV positivos. Outra hipótese está associada à libertação de mediadores imunológicos associados à infeção por HPV. Há ainda a considerar a *up regulation* que se verifica nos genes reguladores do ciclo celular em CPCO HPV+, que pode estar na origem de uma quimiossensibilidade diferente à cisplatina, 5-fluouracilo (5-FU) e paclitaxel (Lohavanichbutr *et al.*, 2009).

A literatura sugere a possibilidade de se utilizar a deteção do HPV como método de individualização da modalidade de tratamento, dado que os doentes CPCO HPV+ são mais resistentes ao 5-FU e ao Paclitaxel. Para estes doentes, a cisplatina e/ou a radiação parecem ser uma melhor opção, embora mais estudos sejam necessários para corroborar as observações anteriores. No entanto, e de acordo com as *guidelines* disponíveis, o tratamento de CPCO HPV+ e de CPCO HPV- não difere. A deteção molecular do HPV é aconselhada, mas não é considerada imprescindível (National Cancer Institute, 2012).

5.9 O papel da vacinação na prevenção do CPCO HPV+

As vacinas atualmente disponíveis no mercado foram concebidas com a finalidade da prevenção do cancro do colo uterino. Até ao momento, existem duas vacinas disponíveis; uma quadrivalente (Gardasil®) que confere proteção contra o HPV 6, 11, 16 e 18, e outra bivalente (Cervarix®) que confere proteção contra o HPV 16 e 18. Os estudos experimentais sugerem que ambas as vacinas têm a capacidade de desencadear uma resposta humoral robusta e bastante eficaz, quando comparadas com a resposta que se observa após infeção natural por HPV, na qual os níveis de anticorpos produzidos são relativamente baixos (Harper *et al.*, 2006). De acordo com a revisão sistemática de Kreimer *et al.*, em 2005, no qual foi feito um *follow up* de 5 anos demonstrou-se 100% de efetividade na prevenção de infeções cervicais persistentes por HPV 16 e 18 em mulheres jovens.

A infeção oral por HPV 16 parece ser o maior fator de risco para o desenvolvimento de CPCO HPV positivo (subtipo este contido em ambas as vacinas anteriormente referidas). Por esta razão tem sido formulada a hipótese de se poder prevenir ou tratar este tipo de tumores, através de vacinas específicas. O real impacto das atuais vacinas na incidência e persistência da infeção oral por HPV está ainda por esclarecer (Ault *et al.*, 2006).

Como vimos, a infeção oral por HPV ocorre por transmissão sexual. Assim, uma vacinação com intuito de prevenção da infeção oral por HPV deveria ser feita idealmente antes do início da atividade sexual (Harper *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos experimentais, têm sido direcionados no sentido de investigar a capacidade que estas vacinas têm em proporcionar uma proteção eficaz relativamente à infeção persistente por HPV a nível ano-genital. É de notar que o efeito protetor destas vacinas na cavidade oral não está descrito (Johnston *et al.*, 2005).

Salienta-se ainda a necessidade de mais estudos, nomeadamente estudos randomizados, para esclarecer a eficácia destas vacinas na possível prevenção da infeção oral por HPV (Johnston *et al.*, 2005).

6. Discussão de resultados

Como vimos anteriormente, o vírus do papiloma humano (HPV) pertence ao género dos *Papillomavirus* e à família *Papovaviridae*. A estrutura do virião do HPV consiste numa cadeia dupla de DNA, protegida por uma cápside composta apenas por duas proteínas estruturais. Pensa-se que toda a informação codificante do HPV se encontra reunida numa das duas cadeias de DNA (Gissmann *et al.*, 1977).

Os HPV são vírus epiteliotrópicos que na maioria dos casos produzem proliferações epiteliais benignas. No entanto, algumas estirpes virais podem estar associadas a transformações malignas (Bernard *et al.*, 2006).

Os HPV são classificados de acordo com o seu potencial oncogénico em HPV de alto risco (AR) e em HPV de baixo risco (BR). Tanto os HPV de alto como os de baixo risco têm a capacidade de desencadear o crescimento de células anómalas. No entanto, apenas os HPV AR conduzem a processos de transformação maligna, dado que apenas a proteína E7 codificada por HPV AR tem a capacidade de imortalizar células epiteliais humanas (Syrjänen *et al.*, 1987; Syrjänen *et al.*, 2010).

Os HPV de AR incluem os subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 73. É, no entanto, importante referir que muitas das infeções que se observam ao nível do colo uterino por HPV AR, regridem naturalmente e não provocam cancro (Miller *et al.*, 2001).

A primeira associação do HPV com o cancro orofaríngeo foi feita em 1983 por Syrjänen *et al.*; Desde então, múltiplos estudos surgiram, tentando esclarecer a possível associação do HPV na etiologia do CPCO.

A hipótese colocada, relativamente aos carcinomas pavimentocelulares associados ao HPV, baseia-se na ocorrência de uma infeção por HPV que ocorre anteriormente ao potencial desenvolvimento do CPCO HPV+. Assim, os fatores de risco associados à infeção oral por HPV, podem ser considerados potenciais fatores de risco para o CPCO HPV+. O mecanismo pelo qual ocorre infeção das vias aerodigestivas superiores não se encontra bem esclarecido (Syrjänen *et al.*, 1987; Gillison *et al.*, 2000).

A infeção oral por HPV em recém nascidos, de mães infetadas, e em jovens antes do início da sua atividade sexual, é extremamente rara. Múltiplos estudos casuísticos sugerem que o HPV é provavelmente transmitido por via sexual e salientam

que determinados comportamentos sexuais aumentam o risco de desenvolvimento de CPCO HPV+, aumentando o risco de infecção com o aumento do número de parceiros sexuais, com história de sexo oro-genital ou oro-anal e com a presença de verrugas genitais (Kelloski *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1998).

O risco para o desenvolvimento de CPCO HPV+ parece estar aumentado em indivíduos imunodeficientes, nomeadamente em indivíduos HIV+. Estes indivíduos apresentam, com maior frequência, infecção oral persistente por HPV e posterior progressão para CPCO. É ainda importante referir a suscetibilidade genética aumentada em doentes com anemia de Fanconi nos processos tumorogénicos, mediados pelo HPV (Palefsky *et al.*, 2009).

Os doentes com tumores orais HPV+ parecem exibir características clínicas distintas dos doentes HPV-. Assim, os doentes que apresentam tumores HPV- têm geralmente idades compreendidas entre os 50 e os 60 anos de idade, fortes hábitos tabágicos e são maioritariamente indivíduos do sexo masculino. Em contraste, os tumores HPV+ ocorrem com igual frequência em indivíduos do sexo masculino e feminino, em indivíduos mais jovens e, frequentemente, em não fumadores e não consumidores habituais de bebidas alcoólicas (Lindel *et al.*, 2001; Gillison *et al.*, 2006).

Apesar da literatura sugerir o envolvimento do HPV, nos processos de CPCO, maioritariamente em doentes não fumadores e não consumidores habituais de bebidas alcoólicas, o nível pelo qual o HPV se pode combinar com o álcool e o tabaco, aumentando o risco de desenvolvimento de processos carcinogénicos ainda não está completamente esclarecido. A informação disponível referente a este ponto é controversa; no entanto, alguns autores referem um efeito sinérgico, enquanto que outros referem apenas um efeito adicional (Schwartz *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 2003).

A International Agency for Research on Cancer (IARC) conduziu um estudo casuístico multicêntrico, relativo a carcinomas orais e orofaríngeos, que teve lugar em nove países diferentes. De todos os casos analisados, 70% apresentavam DNA HPV. O HPV 16, que é responsável pela maioria das infeções ao nível do colo uterino, foi também o subtipo de HPV encontrado com maior frequência a nível oral e orofaríngeo. Este estudo permite-nos concluir que o HPV pode representar um possível fator etiológico em carcinomas que ocorrem ao nível da orofaringe e num pequeno grupo de carcinomas que ocorrem ao nível da cavidade oral (D'Souza *et al.*, 2007).

A maioria das neoplasias potencialmente associadas ao HPV expressam DNA HPV, estando o mesmo, integrado no genoma da célula hospedeira, expressando as oncoproteínas E6 e E7. Pensa-se que a infeção por HPV ocorra através de micro-abrasões, que vão permitir que o vírus infete as células da camada basal que se encontram em divisão mitótica. A maturação viral está intimamente associada ao grau de diferenciação dos queratinócitos (Zerfass *et al.*, 1995).

A proteína E6 codificada por HPV AR liga-se precocemente e induz a degradação da proteína supressora tumoral p53, através de um processo mediado pela ubiquitina, enquanto que a proteína E7 se liga à proteína retinoblastoma (pRb), o que se traduz por uma perda de regulação e imortalização celular epitelial (Anexo 1) (Longworth *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

A perda de regulação do ciclo celular e da apoptose representam o mecanismo central carcinogénico e de integração do DNA HPV na célula hospedeira (Butz *et al.*, 1995; Pyeon *et al.*, 2007).

Tem sido sugerido que os perfis de expressão genética dos carcinomas HPV positivos e negativos apresentem diferenças significativas. Os tumores HPV positivos caracterizam-se por perda da regulação exercida pela pRb e pela Ciclina D1, expressando níveis elevados de p16. Pelo contrário, tumores HPV negativos expressam níveis elevados de pRb e de Ciclina D1 e níveis mínimos de p16. Estes achados biomoleculares enfatizam o potencial valor de marcar molecularmente as proteínas E6 e E7, para posteriormente se proceder à deteção da sua expressão molecular (Shindoh *et al.*, 1995).

A literatura mais recente sugere uma subclassificação dos doentes CPCO, em CPCO HPV positivos, particularmente nos casos que ocorrem ao nível amigdalino e orofaríngeo, por estes apresentarem características clínicas e biológicas específicas e diferentes das dos doentes CPCO HPV negativos (Gillison *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, os CPCO HPV+ histologicamente caracterizam-se por um infiltrado maioritariamente linfocitário e por uma queratinização pouco pronunciada. Estes tumores apresentam baixo grau de diferenciação e menor acumulação de erros genéticos que os CPCO HPV-. Em contraste, nos tumores CPCO HPV- observam-se células poligonais com citoplasma maduro e abundante, as margens celulares estão bem delimitadas e o seu padrão de crescimento é do tipo infiltrativo (Westra *et al.*, 2009).

Atualmente, as *guidelines* disponíveis para o tratamento de CPCO HPV+ e de CPCO HPV- não diferem. A detecção molecular do HPV é aconselhada, embora não seja considerada imprescindível. No entanto, e devido ao facto de os CPCO HPV+ apresentarem um prognóstico mais favorável, alguns hospitais universitários dos EUA e do Reino Unido avaliam de forma rotineira a presença ou ausência do HPV ao nível do cancro orofaríngeo. Assim, é de prever que o mesmo se venha a verificar em alguns dos hospitais europeus (National Cancer Institute, 2012).

Apesar de não se conhecer o mecanismo pelo qual os CPCO HPV+ apresentam melhor prognóstico, sabe-se que as células infectadas por HPV podem sofrer hipóxia o que facilita a indução da apoptose. O tratamento destes doentes melhora a imunidade local, o que favorece a erradicação do HPV. Estes doentes apresentam igualmente melhores resultados quando submetidos a cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. No entanto, a informação atualmente disponível em termos de marcadores imunohistoquímicos e de radio e quimiosensibilidade é controversa (Pintos *et al.*, 2008).

De acordo com os estudos de Pintos *et al.*, em 2008, referentes a casos avançados de carcinoma pavimentocelular, baixos níveis de EGFR e elevados níveis de p16 correspondem a marcadores preditivos de um diagnóstico mais favorável. Por outro lado, também o estudo retrospectivo de Simen-Kapeu *et al.*, 2008, referente ao tratamento cirúrgico de doentes CPCO com o mesmo perfil imunohistoquímico, evidenciou que elevados níveis de p16 estão associados a um menor risco de metastização à distância e ao menor aparecimento de tumores secundários.

A hipótese que sugere que os doentes com CPCO HPV+ apresentem melhores resultados após tratamento cirúrgico tem sido referida por múltiplos autores, dado que os CPCO HPV+ apresentam uma maior capacidade de desencadear mecanismos apoptóticos em resposta a lesões de DNA. Outra razão para este prognóstico mais favorável poderá estar associada à de exposição do epitélio oral e orofaríngeo a agentes carcinogénicos, muitas vezes associada ao desenvolvimento de tumores multifocais (Licitra *et al.*, 2006; Worden *et al.*, 2008).

É então necessário que haja uma melhor compreensão dos mecanismos carcinogénicos mediados pelo HPV, para o potencial desenvolvimento de estratégias direcionadas para este mesmo vírus. Na ausência de mutações celulares, classicamente associadas ao tabaco, a repressão das oncoproteínas E6 e E7, em tumores HPV+, pode traduzir-se por uma restauração das funções normais das proteínas p53 e pRb e pelo

restabelecimento da regulação do ciclo celular e da apoptose. De facto, os tumores HPV+ expressam continuamente as oncoproteínas E6 e E7, mesmo nos estádios mais avançados da doença. Assim, a repressão da expressão viral destas oncoproteínas poderá estar relacionada com a ativação da apoptose em células com lesões ao nível do DNA (Goodwin *et al.*, 2000; Fakyr *et al.*, 2008).

Neste momento, algumas vacinas estão a ser avaliadas em termos de eficácia na prevenção da infeção oral por HPV e também potencialmente do carcinoma pavimentocelular oral e orofaríngeo. Estas vacinas, se eficazes, serão especialmente úteis em indivíduos do sexo masculino. No entanto, não há dados suficientes na literatura, que nos permitam afirmar que as vacinas atualmente existentes para a prevenção do colo uterino sejam eficazes na prevenção da infeção oral por HPV, pelo que não são recomendadas como método primário de prevenção do cancro orofaríngeo (Harper *et al.*, 2006).

Apesar de tratamentos agressivos, que combinam intervenção cirúrgica com posterior radioterapia ou quimioterapia, a taxa de sobrevivência dos doentes CPCO continua a ser baixa devido ao elevado número de recorrências (Licitra *et al.*, 2006; Worden *et al.*, 2008).

7. Conclusões

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento do número de novos casos de carcinoma pavimentocelular, na Europa e nos EUA, sobretudo a nível orofaríngeo, apesar da diminuição da exposição aos fatores de risco clássicos. Neste contexto, foi avaliado o possível papel da infeção por alguns tipos de vírus HPV, nomeadamente 16 e 18, na etiologia do cancro orofaríngeo e particularmente da amígdala.

De acordo com a literatura, os fatores de risco para o desenvolvimento de CPCO HPV+ são os fatores de risco associados à infeção orofaríngea pelo mesmo. Sendo o HPV um vírus reconhecidamente transmitido por via sexual, foi analisada a informação científica de que a via oral-ano-genital pode ser uma via de transmissão do HPV para a cavidade oral, aumentando o risco de infeção com o aumento do número de parceiros sexuais, com história de sexo oro-genital ou oro-anal.

Os HPV são vírus epiteliotrópicos que na maioria dos casos produzem proliferações epiteliais benignas. No entanto, algumas estirpes virais de alto risco podem estar associadas a transformações malignas. A literatura sugere que um mecanismo semelhante ao da carcinogénese cervical se observe a nível orofaríngeo, por interferência dos oncogenes E6 e E7 na regulação do ciclo celular. A análise da expressão destes oncogenes deverá vir a ser o maior foco de investigação futura no estudo da carcinogénese orofaríngea.

Os resultados entretanto obtidos constituem evidência robusta de que esse papel é importante, de modo que a infeção por esses tipos de vírus HPV pode ser considerada como fator de risco para o cancro orofaríngeo.

Os doentes CPCO HPV+ parecem exibir características clínicas distintas dos doentes CPCO HPV-. Os pacientes CPCO HPV- são maioritariamente do sexo masculino e com idades compreendidas entre os 50 e os 60 anos. Para além disso, têm fortes hábitos tabágicos e/ou alcoólicos. Em contraste, os pacientes CPCO HPV+ são tanto do sexo feminino como do sexo masculino, um pouco mais jovens e, frequentemente, não fumadores e não consumidores habituais de bebidas alcoólicas.

Em relação ao tratamento do cancro orofaríngeo, os protocolos terapêuticos consideram quer a cirurgia, quer a radioterapia, de forma isolada, ou em associação, como as modalidades terapêuticas recomendadas.

A razão pela qual os pacientes CPCO HPV+ apresentam uma melhor resposta ao tratamento ainda não está completamente esclarecida, mas está provavelmente associada à existência de resposta apoptótica mediada pela p53 conservada nos tumores HPV positivos; outra hipótese está associada à libertação de mediadores imunológicos associados à infeção por HPV. Este melhor prognóstico pode também resultar da ausência de exposição do epitélio oral e orofaríngeo a agentes carcinogénicos, muitas vezes associada ao desenvolvimento de tumores multifocais.

A literatura sugere a possibilidade de se utilizar a deteção do HPV como método de individualização da modalidade de tratamento. Há, no entanto, que referir as dificuldades inerentes a esta deteção: apesar de as técnicas de PCR estarem definidas como *gold-standard* para deteção do HPV, há uma grande controvérsia no que deve ser considerado evidência fisiopatológica de infeção por HPV. Salienta-se então a necessidade de estudos futuros que possam vir a correlacionar os critérios histológicos com o diagnóstico e mesmo o prognóstico do doente.

As limitações inerentes à abordagem deste tema prendem-se com o facto dos estudos utilizados apresentarem uma variabilidade significativa em termos de dimensão das amostras e também devido à variabilidade das técnicas utilizadas para proceder à deteção molecular do HPV. É ainda de referir que estas últimas apresentam uma sensibilidade variável.

Assim, as *guidelines* disponíveis para o tratamento do CPCO consideram que o tratamento de CPCO HPV+ e de CPCO HPV– não deve ser diferente.

Existem pois diversas áreas de investigação, quer no diagnóstico, quer na terapêutica, quer no estudo da carcinogénese viral, que se afiguram muito importantes no futuro. De qualquer forma, continua a considerar-se que o diagnóstico e tratamento precoces do cancro oral e orofaríngeo são a única forma de melhorar o prognóstico de sobrevivência destes doentes. Para tal é necessário o envolvimento esclarecido dos médicos dentistas e outros profissionais ligados à saúde oral.

8.Bibliografia

- Ault KA, Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract, *Infect Dis Obstet Gynecol*, (Suppl): 40470, 2006;
- Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST, Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications, *Int J Cancer*, 118: 1071-6, 2006;
- Bodily J, Laimin L, Peristance of human papillomavirus infections: keys to malignant progression, *Trend Microbiol*, 19(1): 33-39; 2011;
- Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune WJ, Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus, *J Natl Cancer Inst*, 96: 998-1006, 2004;
- Brocklehurst PR, Baker SR, Speight PM, Factors which determine the referral of potentially malignant disorders by primary care dentists, *J Dent*, 38(7): 569-78, 2010;
- Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J, Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth, *Cancer*, 57(2): 391-95, 1986;
- Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullman A, Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells, *Oncogene*, 10: 927-36, 1995;

- Butz K, Geisen C, Ullmann A, Spitkovsky D, Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis, *Int J Cancer*, 68: 506-13, 1999;
- Califano J, Sidransky D, Ha K, Chang S, Glazer A, Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer: Special issue on multidisciplinary approaches in head and neck cancer, *Oral Oncol*, 45(4-5): 335–339, 2009;
- Campisi G, Giovaenelli L, Controversies surrounding human papillomavirus infection, head & neck versus oral cancer, implication for prophylaxis and treatment, *Head & Neck Oncology*, 1: 8, 2009;
- Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Kurvinen K, Wang L, Frequent mutations of p53 gene in oesophageal squamous cell carcinomas with and without human papillomavirus (HPV) involvement suggests dominant role of environmental carcinogens in oesophageal carcinogenesis, *Br J Cancer*, 70: 346-351, 1994;
- Chernock R, Thorstad W, El-Mofty S, Lewis J, HPV related non-keratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome, *Head and Neck Pathol*, 3: 186-194, 2009;
- Choi S, Myers N, Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: Implications for therapy, Department of head and neck surgery, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA, *J Dent Res*, 87(1): 14-32, 2008;

- Cohen MA, Basha SR, Reichenbach DK, Robertson E, Sewell DA, Increased viral load correlates with improved survival in HPV-16 associated tonsil carcinoma patients, *Acta Otolaryngol*, 128: 583-689, 2008;
- Cruz I, Snijders F, Van Houten V, Vosjan M, Van der Waal, Meijer L, Specific p53 immuno-staining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas, *J Clin Pathol*, 55: 834–840, 2002;
- Danos O, Katinka M, Yaniv M, Human papillomavirus the complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae, *EMBO J*, 1: 231-236, 1982;
- Decuseara G, MacCarthy D, Menezes G, Oral cancer: knowledge, practices and opinions on treatment options, Discipline of Radiation Therapy, School of Medicine, Trinity College, Dublin, *J Ir Dent Assoc*, 57(4): 209-14, 2011;
- De Sousa, Daniel, *Contribuição para o estudo do carcinoma pavimentocelular da mucosa oral, Fatores tumorais de prognóstico*, Tese de doutoramento em Medicina Dentária, Cirurgia Oral, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, 2009;
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML, Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer, Department of epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, USA, *N Engl J Med*, 10; 356(19): 1944-56, 2007;

- D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML, Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection, Department of Epidemiology, *J Infect Dis*, 1; 199(9): 1263-9, 2009;
- D'Souza G, Zhang HH, D'Souza WD, Meyer RR, Gillison ML, Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer, Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, United States, *Oral Oncol*, 46(2): 100-4, 2009;
- Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E, Minkoff H, Wright R, Seaberg E, Gillison M, Relationship between prevalent oral and human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and negative women, John Hopkins Medicine and Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, *J Clin Microbiol*, 44(12): 4479-85, 2006;
- Feller L, Khammissa, Wood N, Lemmer J, Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV, *Head & Face Medicine*, 5:12, 2009;
- Feller L, Wood N, Memmer L, Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Head & Face Medicine*, 6:15, 2010;
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parhin DM, Cancer incidence and mortality worldwide, IARC Cancerbase no.5, version 2.0 Lyon, France: *IARC*, 2004;

- Frithiof L, Wersall J, Virus like particles in human like papilloma, *Acta Otolaryngol*, 64: 263-266, 1976;
- Garrett, LR, Perez-Reyes N, McDougall, JK, Interaction of HPV and nitrosamines in the induction of squamous cell carcinoma, *Oral Oncol*, 14, 329-332, 1993;
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers, *J Natl Cancer Inst*, 92: 709-20, 2000;
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers, Division of Viral Oncology, *J Natl Cancer Inst*, 100(6): 407-20, 2008;
- Gillison ML, Ang KA, Harris J, Wheeler R, Weber R, Human Papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer, *N Eng J Med*, 363: 24-35, 2010;
- Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H, Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates, *Virology*, 76: 569-80, 1977;
- Goodwin EC, Dimaio D, Repression of human papillomavirus oncogenes in cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways, *Proc Natl Acad Sci*, 97: 12513-8, 2000;

- Goon C, Stanley A, HPV & head and neck cancer: a descriptive update, *Head & Neck Oncology*, 1: 36, 2009;
- Greer RO, Goldman HM, Oral papilomas: clinical-pathologic evaluation and retrospective examination for dyskeratosis in 110 lesions, *Oral Surg*, 38: 435-440; 1974;
- Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden, *Acta Otolaryngol*, 125: 1337-44, 2005;
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial, *Lancet*, 367: 1247-55, 2006;
- Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, Menezes A, McClean MD, Matos E, Koifman S, Kelsey KT, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernández L, Daudt AW, Curado MP, Chen C, Castellsagué X, Ferro G, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M, Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, *J Epidemiol*, 39(1): 166-81, 2009;

- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study, *J Natl Cancer Inst*, 95: 1772-83, 2003;
- Herrington CS, Control of human papillomavirus replication: implications for squamous neoplasia, *J Pathol*, 178: 237–8, 1996;
- Hristozova T, Konschak R, Fusi A, Tinhokfer I, The presence of circulating tumor cells correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region, *Annals of Onc*, 22: 1878-1885, 2011;
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic, Risks to Humans. Human papillomaviruses, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 64: 1-378, 1995;
- Johnston KB, Monteiro JM, Schultz LD, Protection of beagle dogs from mucosal challenge with canine oral papillomavirus by immunization with recombinant adenoviruses expressing codon-optimized early genes, *Virology*, 336: 208-18, 2005;
- Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR detection of oralhuman papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections, *J Oral Pathol Med*, 21: 459-64, 1992;

- Klussman JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas, *Cancer*, 92(11): 2875-84, 2001;
- Klussman J, Mooren J, Lehen M, Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications, *Clin Cancer Res*, 15: 1779-86, 2009;
- Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M, HPV detection in children prior to sexual debut, *Int J Cancer*, 73: 621-4, 1997;
- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus, *J Infect Dis*, 189: 686-98, 2004;
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide a systematic review, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 467-75, 2005;
- Kreppel M, Drebber U, Rothamel D, Eich HT, Kübler A, Scheer M, Zöller JE, Prognostic impact of different TNM-based stage groupings for oral squamous cell carcinoma, *Head and Neck*, 33(10): 1467-75, 2011;
- Lang K, Sussman M, Friedman M, Su J, Jan HJ, Mauro D, Incidence and cost of treatment-related complications among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 135: 582-588, 2009;

- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma, *Cancer*, 92: 805-13, 2001;
- Levine AJ, The p53 protein and its interactions with oncogenes products of the small DNA tumour viruses, *Virology*, 177, 419-426, 1990;
- Licitra L, Perrone F, Bossi P, High risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma, *J Clin Oncol*, 24: 5630-6, 2006;
- Lohavanichbutr P, Houck J, Yueh B, Farwell D, Schwartz S, Genome-wide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 135(2): 180-188, 2009;
- Longworth MS, Laimins LA, The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31, *J Virol*, 78: 3533-41, 2004;
- Longworth M, Wilson R, HPV E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs, *Embryo J*, 24: 1821-30, 2005;

- Marklund L, Hammarstedt L, Impact of HPV in oropharyngeal cancer, *Journal of Oncology*, 56(3): 19-28, 2010;
- Meyer R, D'Souza G, D'Souza W, Gillison ML, Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV 16-positive and HPV-negative head and neck cancer, *Oral Oncol*, 46(2): 100, 2010;
- Miller CS, Johnstone BM, Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, *Oral Surg*, 91: 622-35, 2001;
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature Reviews Cancer*, 10: 550-560, 2010;
- Muñoz N, Bosch FX, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group; Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N Eng Med*, 438(6): 518-27, 2003;
- Nicolotti N, Chuang SC, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Bosetti C, Brenner H, Hosono S, La Vecchia C, Matsuo K, Müller H, Muscat J, Paludetti G, Ricciardi G, Boffetta P, Hashibe M, Boccia S, Recreational physical activity and risk of head and neck cancer: a pooled analysis within the international head and neck cancer epidemiology, *Eur J Epidemiol*, 26(8): 619-28, 2011;

- Oane E, Rithchie M, Hoffman T, Human Papilloma virus the importance of early diagnosis and risk of head and neck cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 56(6), 2011;
- Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Obelek S, Jarzabek-Chorzelska M, Jibard N, Identification of papillomaviruses in butcher's warts, *J Invest Dermatol*, 76: 97-102, 1981;
- Osthus AA, Aarstad AK, Olofsson J, Aarstad HJ, Head and neck specific health related quality of life scores predict subsequent survival in successfully treated head and neck cancer patients: a prospective cohort study, 47(10): 974-9, 2011;
- Palefsky J, Human papillomavirus-related disease in people with HIV, *Curr Opin HIV*, 4: 52-6, 2009;
- Pannone B, Wood N, Memmer L, The role of Human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: An Overview, *Head & Face Medicine*, 6: 4, 2011;
- Pathak K, Sutherland DS, Nason D, Squamous cell carcinoma of the oropharynx: influence of site of primary tumor, *Oral Oncology*, Supplement 3 (1): 73, 2009;
- Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring, *Cancer*, 79: 595-604, 1997;

- Petersen P, Oral Cancer prevention and control the approach of the World Health Organization, *Oral Oncology*, 45(4-5): 454-60, 2009;
- Pindborg J, *Atlas of Disease of the Oral mucosa*, 4th edition. Munksgaard, Copenhagen, 1985;
- Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Miranda AC, Limbert E, *Cancer in Portugal*, IARC Technical Publication n° 38, Lyon , 2002;
- Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada, *Oral Oncol*, 44: 242-50, 2008;
- Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Marsit CJ, Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers, *Cancer Res*, 67: 4605-19, 2007;
- Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, *Oral Pathology and Clinical Pathologic Correlations*, 5th edition, Elsevier Saunders, 2008;
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffman TK, Combined analysis of HPV DNA, p16, and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer, *Int J Cancer*, 120: 1731-1738, 2007;

- Rintala M, Grénman S, Syrjänen KJ, Syrjänen MS, High risk types of Human Papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants, *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1728-33, 2005;
- Rubin J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Levels of TGF alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival, *J Natl Cancer Inst*, 90(11): 824–32, 1998;
- Santarelli A, Rosso L, New perspectives in medical approach to therapy of head and neck squamous cell carcinoma, *Minerva Stomatologica*, 58(9): 445-52, 2009;
- Schwartz E, Durst M, Demankowski C, Latterman O, Zech R, Wolfspurger E, Suhai S, Zur Hausen H, DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6, *Embo J*, 2: 2341-2348, 1983;
- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human Papillomavirus infection, *J Natl Cancer Inst*, 90: 1626-36, 1998;
- Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG, Human papillomavirus type 16 DNA sequence, *Virology*, 145: 181-5, 1985;
- Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, Detection of human papillomavirus

DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression, *Cancer*, 76: 1513-21, 1995;

- Simen-Kapeu A, Kataja V, Yliskoski M, Syrjänen K, Dillner J, Koskela P, et al, Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection, *Scand J Infect Dis*, 40: 745-51, 2008;

- Smith E, Rithchie M, Hoffman T, Human Papillomavirus in oral exfoliates cells and risk of head and neck cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 96(6), 2004;

- Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL; Turek LP, Haugen TH, Human Papillomavirus and risk of oral cancer, *Laryngoscope*, 108: 1098-103, 1998;

- Snidjers PJ, Meijer CJ, Van der Brule AJ, Snow GB, Walboomers JM, Human Papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA, *J Gen Virol*, 73: 2059-66, 1992;

- Southern SA, Herrington CS. Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: morphological correlation with HPV infection, *Int J Cancer*, 70: 502–7, 1997;

- Stanley M, Lowy DR, Frazer I, Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms, *Vaccine*, 24(Suppl3): S3/106-13, 2006;

- Stanley MA, Pett MR, Colemann, HPV from infection to cancer, *Biochem Soc Trans*, 35: 1456-60, 2007;
- Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation, *J Virol*, 70: 6987–93, 1996;
- Syrjänen KJ, Syrjänen MS, Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma, *ORL*, 43: 181-194, 1981;
- Syrjänen KJ, Syrjänen MS, Lamberg MA, Human Papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity, *Proc Finn Dent Soc*, 79: 1-8, 1983;
- Syrjänen KJ, Syrjänen MS, Phyrhonen S, Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions, *Brit J Oral Surg*, 21(2): 147-53, 1983;
- Syrjänen KJ, Syrjänen MS, Happonen RP, Calonius B, Human papillomavirus antigens and local immunologic reactivity in oral squamous cell tumours and hyperplasias, *Scand J Dent Res*, 92: 358-370, 1984;
- Syrjänen KJ, Gissman L, Koss G, *Papillomaviruses and Human disease*, Springer-Verlag, 1987;

- Syrjänen K, HPV infections and oesophageal cancer, *J Clin Patol*, 55: 721-728, 2002;
- Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhoanen S, Nuutinen J, Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis, *Int J Oral Surg*, 12: 418-24, 1983;
- Syrjänen MS, Human papillomavirus infections and oral tumours, *Medical Microbiology and Immunology*, 192(3): 123-138, 2003;
- Syrjänen MS, HPV infection and tonsillar carcinoma, Institute of Dentistry and Faculty of Medicine, University of Turku, *J Clin Pathol*, 57: 449-455, 2004;
- Syrjänen MS, Current concepts on human papilloma virus in children, Institute of Dentistry and Faculty of Medicine, University of Turku, *APMIS*, 118 (6):494-509, 2010;
- Syrjänen MS, The role of HPV in head and neck carcinomas, Institute of Dentistry and Faculty of Medicine, University of Turku, *Annals of Oncol*, 21: 449-465, 2010;

- Syrjänen MS, HPV in Head and Neck cancers, Institute of Dentistry and Faculty of Medicine, University of Turku, *New England Journal of Medicine* 356; 19, 2010;
- Turati F, Garavello W, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C, Negri E, A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers, Part 2: results by subsites, *Oral Oncol*, 46(10): 720-6, 2010;
- Uchida K, Oga A, Okafuji M, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, Molecular cytogenetic analysis of oral squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization, *Cancer Genet Cytogenet*, 167(2): 109–16, 2006;
- Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat NB, Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study, *Am J Obstet Gynecol*, 178: 365-73, 1998;
- Weinberger PM, Molecular classification identifies a subset of human Papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favourable prognosis, *J Clin Oncol*, 24: 736-47, 2006;
- Westra WH, The changing face of head an neck cancer in the 21st century: The impact of HPV on epidemiology and pathology of oral cancer, *Head and Neck Pathol*, 3: 78-81, 2009;

- Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number, *J Clin Oncol*, 26: 3138-46, 2008;
- World Health Organization, *The World Oral Health Report 2008*, Geneva: World Health Organization; 6-7, 2008;
- Wynder EL, Bross IJ, A study of etiological factors in cancer of the esophagus, *Cancer*, 14, 389-413, 1961;
- Zerfass K, Schultze A, Spitkovsky D, Friedman V, Hengkin B, Jansen-Durr P, Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation, *J Virol*, 69: 6389-99, 1995;
- Zhang B, Chen W, Roman A, The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation, *Proc Natl Acad Sci*, 103: 437-42, 2006;
- Zur Hausen H, Viruses in Human cancers, *Science*, 254, 1167-1173, 1991;
- Zur Hausen H, Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account, *Virology*, 384: 260-5, 2009;

Lista de sites:

- **American Cancer Society**, último acesso em 23 de Maio de 2012, em <http://www.cancer.org/Cancer/OralCavityandOropharyngealCancer/DetailedGuide/index>;
- **International Agency for Research on Cancer (IARC)**, último acesso em 19 de Maio de 2012, em <http://www.iarc.fr/>
- **National Cancer Institute**, último acesso em 20 de Maio de 2012 em: <http://www.cancer.gov/aboutnci/ncicancerbulletin/archive/2009/081109/page2>;
- **National Health System, (NHS)** acesso em 20 de Maio de 2012 em: <http://www.nhs.uk/news/2010/03march/pages/rise-in-mouth-cancer-linked-to-sti.aspx>;
<http://www.nhs.uk/news/2012/01january/pages/oral-cancer-bigger-risk-for-men.aspx>.

ANEXOS

Mecanismo de infecção oral pelo HPV

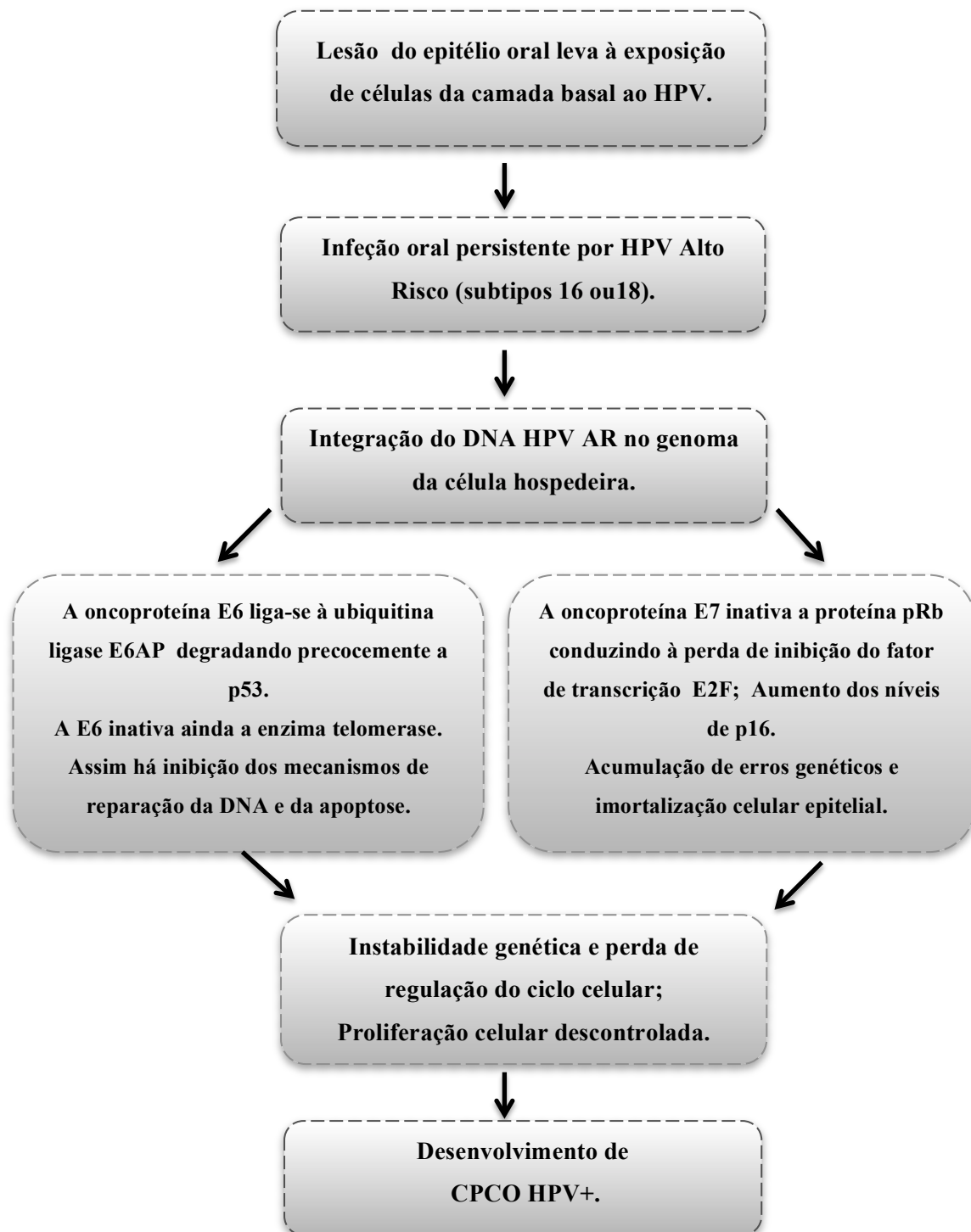


Fig.1- Representação do mecanismo de infecção oral por HPV associado à expressão das oncoproteínas E6 e E7.